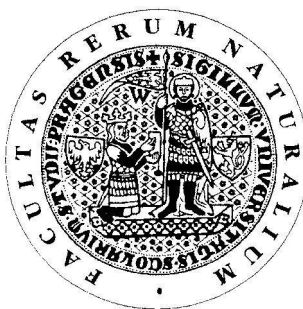


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Kateřina Nepomucká

ZMĚNY GENOVÉ EXPRESE V DIABETICKÉ NEFROPATII

Gene expression profiling in diabetic nephropathy

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Gabriela Pavlínková, Ph.D.

Konzultant: Doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení:

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Gabriely Pavlínkové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

V Praze 25.5. 2012

Podpis:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Gabriele Pavlínkové, Ph.D. za vynikající vedení této práce. Dále Doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. za cenné rady při psaní této práce. Velký dík patří Ing. Romaně Bohuslavové za čas, který mi věnovala během práce na tomto projektu.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu a zázemí, které mi poskytovali během mého studia.

Abstract

Diabetic nephropathy (DN) is induced by both type 1 and type 2 diabetes mellitus and it is one of the most serious complications associated with diabetes. Despite increasing incidence of diabetes, the exact pathogenesis remains unclear. Hypoxia is regarded as a crucial factor for the progression of renal disease. The responses to hypoxia are mainly regulated by hypoxia-inducible factor 1 (HIF1). We thus considered a possible link between HIF1-regulated pathways and the susceptibility to DN and the disease progression. We hypothesize that the exposure of renal tissue to diabetes causes gene expression changes in HIF1-regulated pathway and the altered expression profile is decisive for the development of DN. Using mouse model, we analyzed cellular and molecular changes in HIF1 α heterozygous-null (*Hif1 α ^{+/-}*) and wild type (*wt*) littermates exposed to diabetic environment. Our histological analysis showed early pathological changes associated with DN in both diabetic *wt* and *Hif1 α ^{+/-}* compared to non-diabetic controls. The morphological analysis did not demonstrate the effect of *Hif1 α ^{+/-}* genotype in comparison to *wt*. For our molecular analysis with qRT-PCR method, we selected several genes, which were previously associated with pathological processes in kidney diseases. We identified statistically significant changes in gene expression of *Spp1* and *Cxcr4* in renal cortex and pulp. The relative expression of *Thbs1* was only increased in renal pulp. The differences in response to diabetic environment between *Hif1 α ^{+/-}* heterozygotes mutants and *wt* were detected in *Spp1* and *Cxcr4* genes. These results confirm our original hypothesis that HIF1-regulated pathways are significantly influenced by diabetes mellitus and their target molecules participate in the development of DN.

Key words: diabetic nephropathy, gene profiling, *Cxcr4*, *Glut1*, *MIP-1 α* , *Nphs2*, *Spp1*, *Thbs1*, *TNF α* , *Vcam1*, *HIF1 α*

Abstrakt

Diabetická nefropatie (DN) vzniká důsledkem působení diabetu mellitu I. a II. typu a patří k nejčastějším mikrovaskulárním komplikacím diabetu. Diabetes mellitus představuje jednu z hlavních příčin konečného stádia onemocnění ledvin. Mikrovaskulární komplikace jsou také spojovány s hypoxií v tkáních a s aktivací HIF1 α regulované metabolické dráhy. V této studii jsme předpokládali, že v důsledku působení časného diabetu na ledvinovou tkáň se mění profil exprimovaných genů, a že tyto změny v genové expresi jsou pak klíčové při rozvoji diabetických mikrovaskulárních komplikací a DN. Ve studii byl použit myší model, v jehož jedné alele byl blokován gen pro transkripční faktor *Hif1 α* , u kterého jsme předpokládali vliv na rozvoj DN. Provedli jsme srovnávací morfologické a molekulárně-genetické analýzy časného působení diabetu na tkáň ledvin. Při posouzení morfologických změn v diabetické ledvině mezi kontrolou („wild type“, *wt*) a heterozygotními *Hif1 α ^{+/-}* mutanty jsme detekovali stejné prvotní patologické změny spojované s DN. Pro naše molekulární analýzy pomocí metody qRT-PCR jsme vybrali několik genů, které byly v předchozích studiích spojovány s patologickými procesy v ledvinách (*Cxcr4*, *Glut1*, *MIP-1 α* , *Nphs2*, *Spp1*, *Thbs1*, *TNF α* , *Vcam1*). Identifikovali jsme statisticky signifikantní změny v expresi genů *Thbs1*, *Spp1* a *Cxcr4*. Zvýšení exprese *Spp1* a *Cxcr4* bylo pozorováno v kůře i ve dřeni ledvin pokud dochází k poškození celého nefronu. Relativní exprese *Thbs1* byla zvýšena pouze ve dřeni, což naznačuje, že se tento genový produkt podílí pouze na poškození tubulární části nefronu. Naše výsledky potvrzují počáteční hypotézu, že diabetes mellitus významně ovlivňuje regulační dráhy cílové molekuly HIF1 α , která se se účastní rozvoje DN.

Klíčová slova: diabetická nefropatie, genové profilování, *Cxcr4*, *Glut1*, *MIP-1 α* , *Nphs2*, *Spp1*, *Thbs1*, *TNF α* , *Vcam1*, HIF1 α

1. Seznam použitých zkratk

AGE pokročilé produkty glykace (z anglického „*advanced glycation end-products*“)

cDNA komplementární DNA

Cxcr4 chemokin (C-X-C motif) receptor 4

DM diabetes mellitus

DN diabetická nefropatie

DPX směs distyrenu, změkčovače (dibutylftalát) a xylenu (z anglického „*distyrene, plasticizer, xylene*“)

ECM extracelulární matrix

EDTA ethylendiamintetraoctová kyselina

FVB z anglického „*friend leukemia virus B*“

Glut1 glukosový transpostér 1

Hif1 α gen kódující Hypoxií indukovaný faktor 1 (z anglického „*Hypoxia-inducible factor*“)

Hprt1 gen kódující hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasu (z anglického „*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*“)

MIP-1 α zánětlivý protein buněk makrofágů (z anglického „*macrophage inflammatory protein 1 α* “)

NK přirození zabíječi z anglického „*natural killer cell*“

Npfs2 gen kódující podocin

PBS pufr (složení viz. kapitola 3.1.5 Složení použitých roztoků, strana 22)

PFA paraformaldehyd

PKC proteinkinasa C

qRT-PCR kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase
(z anglického „*quantitative real time polymerase chain reaction*“)

RAGE receptory pokročilých produktů glykace (z anglického „*receptor for advanced glycation end-products*“)

Ssp1 gen kódující osteopontin

STZ streptozotocin

TBE pufr (složení viz. kapitola 3.1.5 Složení použitých roztoků, strana 2)

TGFβ transformující růstový faktor beta (z anglického „*transforming growth factor beta*“)

Thbs1 gen kódující thrombospondin

TNFα tumorový nekrotický faktor alfa (z anglického „*tumor necrosis factor*“)

Vcam1 vaskulární adhezivní molekula (z anglického „*vascular cell adhesion molecule 1*“)

Obsah

1. Seznam použitých zkratk.....	6
2. Teoretický úvod	10
2.1 Diabetes mellitus - základní charakteristika	10
2.1.1 Diabetes mellitus 1. typu	10
2.1.2 Diabetes mellitus 2. typu	10
2.2 Chronické komplikace při diabetu mellitu	11
2.3 Diabetická nefropatie	11
2.3.1 Morfologické změny při rozvoji diabetické nefropatii.....	11
2.3.2 Chronické procesy při diabetu mellitu	13
2.3.2.1 Chronická hyperglykémie.....	14
2.3.2.2 Chronická hypoxie	15
2.3.2.3 Zánětlivý proces.....	16
2.3.2.4 Glomeruloskleróza a tubulointersticiální fibróza.....	17
3. Cíl práce	19
4. Materiál a metody	20
4.1 Materiál	20
4.1.1 Komerční soupravy.....	20
4.1.2 Primery	20
4.1.3 Chemikálie.....	21
4.1.4 Enzymy.....	21
4.1.5 Složení použitých roztoků.....	22
4.1.6 Laboratorní přístroje a zařízení	22
4.2 Metody	23
4.2.1 Experimentální myší model	23
4.2.1.1 Charakteristika modelového organismu.....	23
4.2.1.2 Izolace DNA a určení genotypu	23
4.2.1.3 Navození diabetu	25
4.2.2 Odběr ledvin	25
4.2.3 Izolace RNA	26
4.2.4 Reverzní transkripce.....	26
4.2.5 Kvantitativní PCR v reálném čase	27

4.2.6	Histologická analýza.....	28
4.2.6.1	Příprava řezů	28
4.2.6.2	Barvení a fixace řezů	28
5.	Výsledky	30
5.1	Uvedení do diabetu	30
5.2	Změny ve fenotypu myšího modelu	30
5.3	Změny v genové expresi	33
6.	Diskuze.....	36
7.	Souhrn.....	38
8.	Seznam použité literatury	39

2. Teoretický úvod

2.1 Diabetes mellitus - základní charakteristika

Diabetes mellitus (DM) je onemocnění, při kterém je porušena homeostáza glukosy v organismu a dělí se dle typu poruchy na:

- I. Diabetes mellitus 1. typu
- II. Diabetes mellitus 2. typu

2.1.1 Diabetes mellitus 1. typu

Je autoimunitní onemocnění, zapříčiněné nedostatečnou sekrecí insulinu β -buňkami pankreatických Langerhansových ostrůvků. Nedostatečná sekrece insulinu je způsobená postupnou destrukcí β -buněk imunitním systémem. Hlavní podíl na tomto ději mají T-lymfocyty^[5].

2.1.2 Diabetes mellitus 2. typu

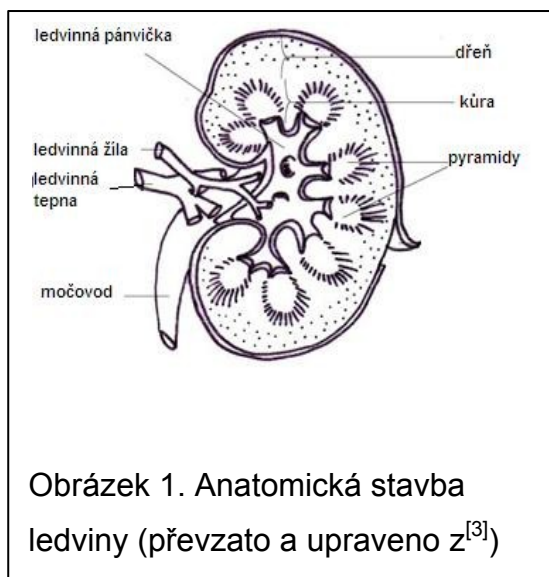
Tento typ DM je spojován se životním stylem. Právě ten z převážné většiny případů určuje, zda se polygenní predispozice manifestuje, či ne. Existují dva hlavní subtypy tohoto onemocnění: insulinová rezistence a insulinová deficeience. Insulinová rezistence představuje sníženou citlivost tkáně na insulin. Příčinou této rezistence je porucha v přenosu signálu, který buňku informuje o přítomnosti glukosy v buňce. Tato porucha může být vyvolána snížením počtu insulinových receptorů. Insulinový deficit je spojen se špatnou funkcí β -buněk, jež nejsou schopné produkovat insulin v dostatečném množství. Ve většině případů se vyskytují oba subtypy společně^[5].

2.2 Chronické komplikace při diabetu mellitu

Dlouhodobé vystavení působení DM vede k patologickým (jak biochemickým, tak morfologickým) změnám v orgánových systémech a to především v důsledku dlouhodobého působení hyperglykémie, která je způsobena poruchou metabolických drah při nedostatku insulinu resp. při přenosu signálů insulinovým receptorem do buňky. K největšímu poškození dochází v cévním systému ^[6]. Výsledným projevem biochemických deviací jsou především poruchy cévní stěny, které vedou až k patologickým projevům. Cévní soustava je poškozena celá, přičemž intenzita poškození se může lišit. Poškození kapilárního úseku vede k rozvinutí diabetické mikroangiopatie, jež nejvíce ovlivňuje tkáně, ve kterých hypoxické podmínky zvyšují riziko vzniku patologie. Hypoxie je tedy dalším vážným faktorem, který se uplatňuje při rozvoji chronických komplikací. Typickými komplikacemi spojenými s hypoxií jsou diabetická retinopatie, neuropatie a nefropatie^[5].

2.3 Diabetická nefropatie

Diabetická nefropatie (DN) je klinický syndrom projevující se při diabetu obou typů. Tento syndrom je doprovázen jak morfologickými, tak pato-biochemickými odchylkami, které mohou vést až k selhání funkce ledvin.



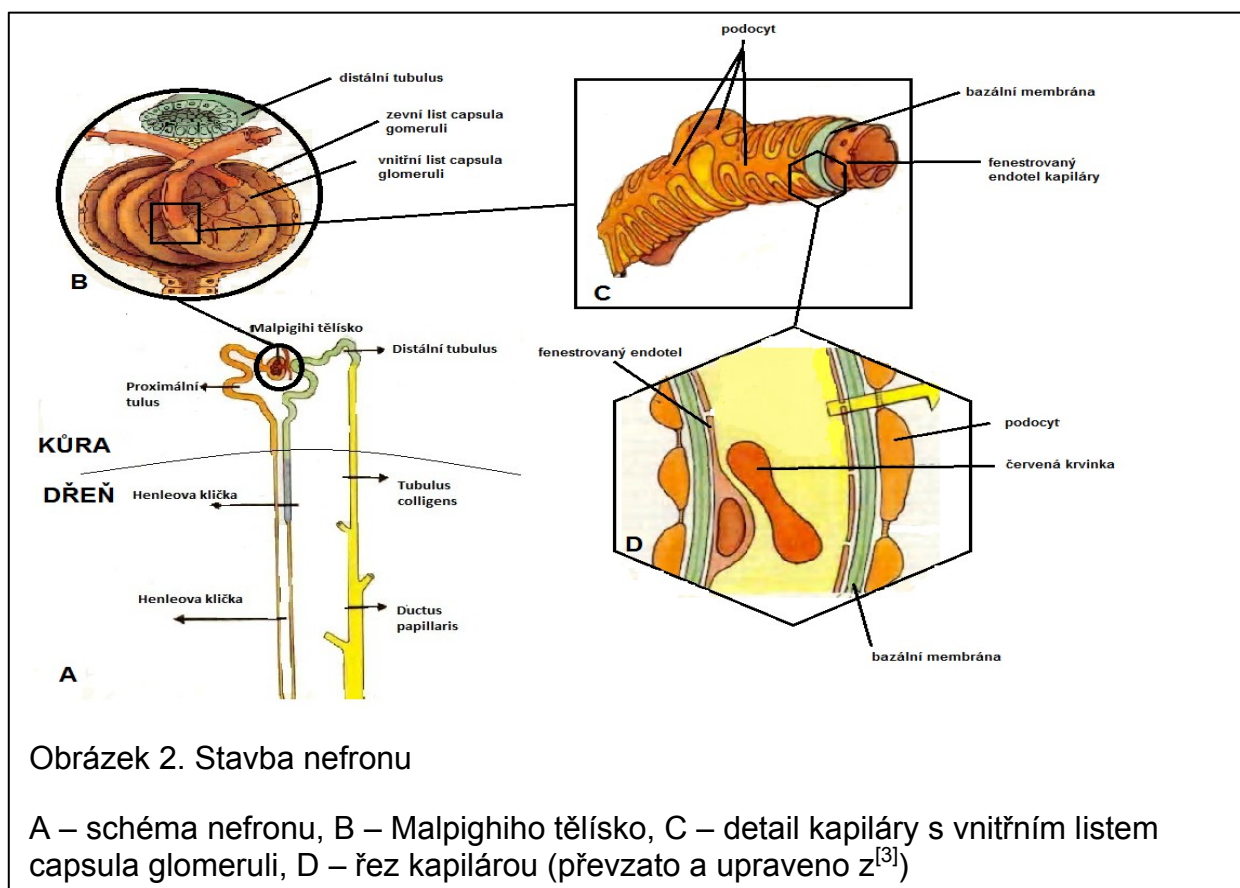
Obrázek 1. Anatomická stavba ledviny (převzato a upraveno z^[3])

2.3.1 Morfologické změny při rozvoji diabetické nefropatie

Stavba ledviny

Ledvina je složena ze tří základních částí: kůra, dřev a pánvička (Obrázek 1.). Funkční strukturní jednotka ledviny je nefron, který je zodpovědný za vlastní

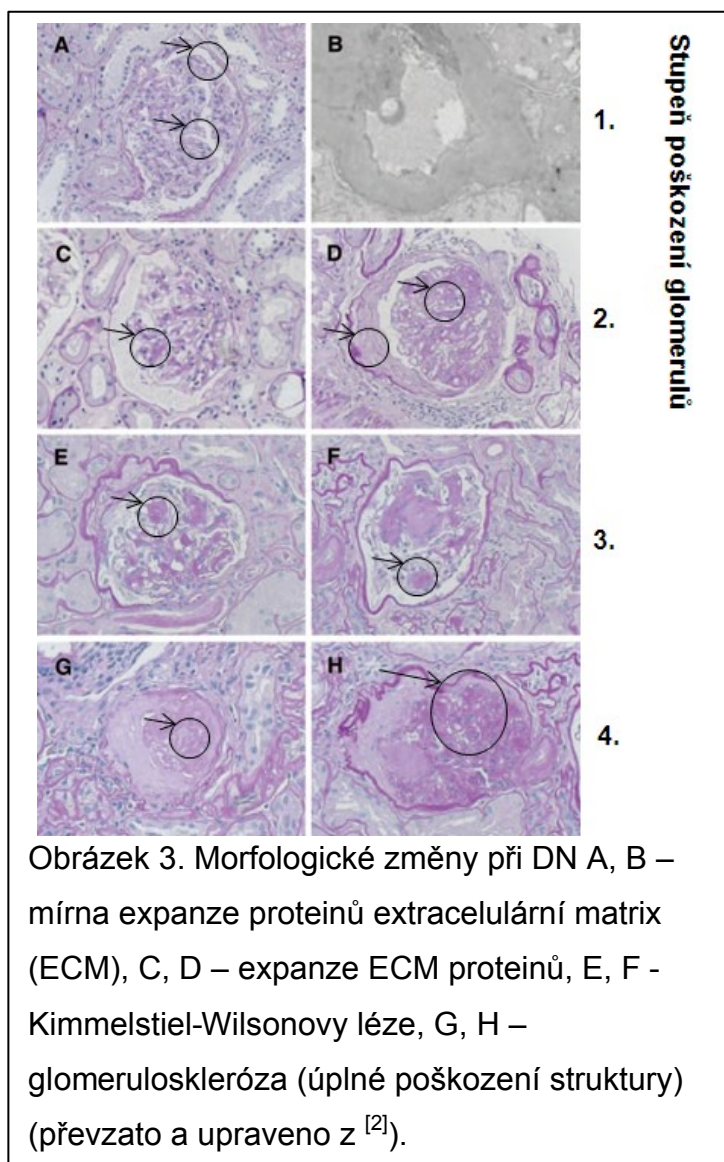
filtraci krve. Ten je složen z několika částí: Malpighiho tělíska, proximálního tubulu, Henleovy kličky, distálního tubulu, tubulu collignes a ductu papillaris. Malpighiho tělísko je složeno z dalších součástí: glomerulu, capsule glomeruli (tzv. Bowmanova pouzdra), podocytů a mesangiálních buněk. Tyto části jsou strukturně orientovány v ledvinné tkáni přesně definovaným způsobem, jak je zobrazeno na Obrázku 2^[3].



Morfologické změny při rozvoji diabetické nefropatie

Podle stupně morfologického poškození glomerulů je možné rozdělit rozvoj tohoto onemocnění do čtyř skupin, které jsou znázorněny na Obrázku 3. Morfologické změny jsou rozděleny podle stupně hromadění proteinů extracelulární matrix (ECM)^[7].

- 1) První třída zahrnuje pouze malá poškození. Tímto poškozením je zesílení bazální membrány, ke kterému dochází v důsledku akumulace ECM. Poškození je velmi malé, na histologických řezech není pozorována prakticky žádná změna (Obrázek 3. A, B).



2) Do druhé třídy jsou zařazovány morfologické změny, kdy je již pozorovatelná mírná expanze mesangia, ke které dochází opět v důsledku akumulace ECM. Tato změna má za následek zmenšení filtrační plochy a dochází tedy ke snížení účinnosti filtrace krve (Obrázek 3. C, D)^[2].

3) Třetí třída je charakterizována přítomností Kimmelstiel-Wilsonovými lézemi. Tyto léze jsou složeny převážně z kolagenových vláken. Jedná se již o vážné poškození funkce ledvin, při kterém dochází ke vzniku nodulární sklerózy (Obrázek

3. E, F)^[2, 8].

4) Do poslední, čtvrté, skupiny patří patologie, kdy dochází ke glomeruloskleróze ve více než 50% tkáně ledvin. Jedná se o nejvyšší stupeň poškození orgánu (Obrázek 3. G, H)^[2].

2.3.2 Chronické procesy při diabetu mellitu

Diabetes mellitus je chronické onemocnění, které po delším časovém období vede k ireverzibilním změnám v tkáních. Hlavním procesem, který vede k poškození tkání, je chronická hyperglykémie, která vyvolává chronickou hypoxii a je s ní spojen i zánětlivý proces.

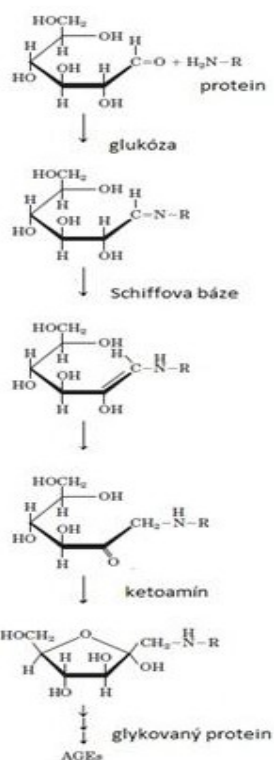
2.3.2.1 Chronická hyperglykémie

Metabolismus glukosy v organismu je velmi přísně řízen, proto i koncentrace glukosy v plazmě je udržována v poměrně malém rozmezí. V případě potřeby rychlého zdroje energie je glukosa po vstupu do buňky fosforylována a vstupuje do glykolýzy. Tam je postupně zpracována tzv. oxidativní cestou, při které je produkt glykolýzy substrátem pro citrátový cyklus a následnou oxidativní fosforylaci. Tato cesta vede k zisku 30 – 32 molekul ATP na 1 molekulu glukosy. V opačném případě je fosforylovaná glukosa vedena tzv. neoxidativní cestou zpracování a je využita pro syntézu látky zásobní, glykogenu. Při dlouhodobém zvýšení koncentrace tohoto monosacharidu dochází k negativnímu ovlivnění nejenom buňky samotné, ale i mimobuněčného prostředí. Dochází ke stimulaci alternativních procesů (např. neenzymové glykace, či aktivaci proteinkinasy C

(PKC))^[9].

Neenzymová glykace

Neenzymová glykace je samovolně probíhající děj, který vede ke vzniku proteinů s glukosou navázanou přes volnou aminoskupinu (převážně lysinu). Produktem této reakce je tvorba Schiffovy báze, která se Amadoriho přesmykem mění na ketoamin. Z něj pak vznikají pokročilé produkty glykace (z anglického „*advanced glycation end-products*“ (AGE))^[10]. Tento popsáný mechanismus je zobrazen na Obrázku 4. Tento děj probíhá v místech, kde dochází ke kontaktu glukosy s proteinem a to jak intracelulárně, tak i extracelulárně. Důsledkem glykace je změna fyzikálních a chemických vlastností takto pozměněných proteinů (AGE) (např. stabilita, odolnost, aktivita). Produkty AGE jsou identifikovány příslušnými receptory



Obrázek 4. Neenzymová glykace

AGEs – pokročilé produkty glykace
(převzato a upraveno z^[4])

(z anglického „*receptor for advanced glycation end-products*“ (RAGE)). Tyto receptory se vyskytují na povrchu endoteliálních buněk. Interakcí substrátu s receptorem jsou aktivovány signalizační dráhy vedoucí až ke zvýšené syntéze cytokinů, které pak ovlivňují další funkce buňky jako takové i mezibuněčné interakce v okolní tkáni^[5].

2.3.2.2 **Chronická hypoxie**

Chronická hypoxie je definována jako nedostatečné zásobení tkáně kyslíkem. Při tomto stavu buňky přechází z aerobního metabolismu na anaerobní. Glykolýza se tedy stává dominantním zdrojem energie^[11]. Nízká koncentrace kyslíku v buňce vede ke zvýšení transkripce řady faktorů účastnících se metabolismu, apoptózy, angiogeneze a vaskularizace. Hlavním transkripčním faktorem regulující odpovědi na snížení koncentrace O₂ je hypoxií indukovaný faktor 1 (HIF1).

Hypoxií indukovaný faktor 1

HIF1 je heterodimer složený z O₂-regulované podjednotky HIF1 α a konstitutivně exprimované podjednotky HIF1 β ^[12]. Biologická aktivita HIF1 je určována expresí a aktivitou HIF1 α podjednotky. Regulace exprese a *in vivo* aktivity genu *Hif1 α* se odehrává na mnoha úrovních, které zahrnují expresi, translaci a transaktivaci. Pokud se buňka neocitá v hypoxii, je HIF1 α ubiquitinován a proteosomálně degradován. V opačném případě je degradace HIF1 α inhibována a dochází k akumulaci HIF1 α v buňce^[13]. HIF1 přímo reguluje 800 cílových genů, jejichž proteinové produkty se účastní energetického metabolismu, angiogeneze, erytropoézy, proliferace buňky a neovaskularizace^[11b, 14]. Na přímé aktivaci genu *HIF1 α* se podílejí i další faktory, např. NO, fumarát a především reaktivní formy kyslíku^[15]. Také cytokiny, jako interleukin 1 beta (IL-1 β), faktor nádorové nekrózy alfa (z anglického „*tumor necrosis factor*“ (TNF α)) a interferon gama (IFN- γ), zvyšují transkripční aktivitu HIF1 α ^[16].

Geny regulované transkripčním faktorem HIF1 α

HIF1 α specificky reguluje genovou expresi glykolytických enzymů, transportérů glukosy (Glut1), růstových faktorů a chemokinů (chemokin (C-X-C motiv) receptor 4 (Cxcr4))^[17]. Nejvíce jsou tyto geny exprimovány v podocytech, kde je také HIF1 α nejvíce aktivní^[11b].

Chemokiny a jejich receptory hrají významnou roli při vzniku zánětu v glomerulech. Ve „zdravém“ glomerulu *Cxcr4* není exprimován. V průběhu vývoje diabetické nefropatie dochází ke zvýšení exprese *Cxcr4* na membránách podocytů^[11b, 18]. *Glut1* je dalším genem, který je regulován Hif1 α , a který řídí v ledvinách transport glukosy. Při hyperglykémii je v podocytech zvýšena i exprese mRNA kódující tento protein^[19]. Exprese *Glut1* je také řízena cytokinem, který je v anglické literatuře označován jako TGF β (z anglického „*transforming growth factor beta*“), který reaguje na akumulaci ECM proteinů^[7, 9a].

2.3.2.3 Zánětlivý proces

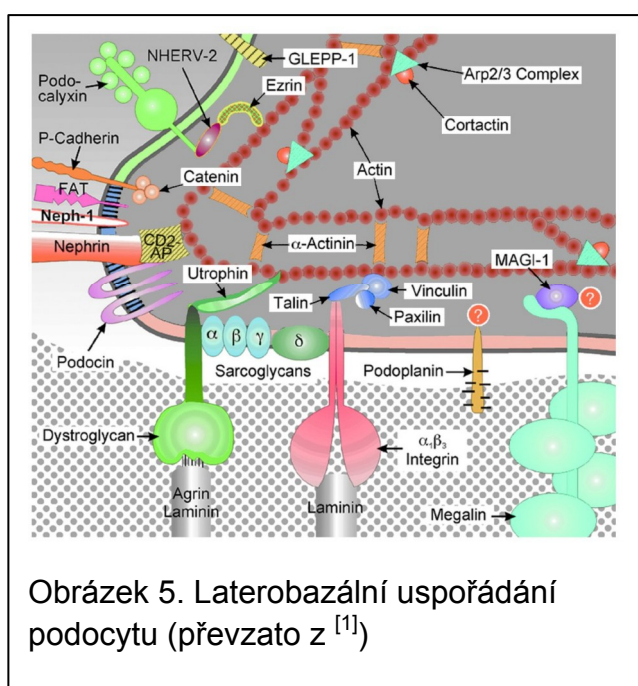
Zánětlivý proces je jedním z nejvýznamnějších patologických faktorů, který se projevuje při vzniku mikro- a makrovaskulárních onemocnění. Jak při diabetu 1. typu, tak 2. typu byly v krevním řečišti byly detekovány zánětlivé markery^[20]. Přetrvávající zánět může vést až k vážnému poškození funkčních jednotek ledvin – nefronů. Hlavní funkční částí nefronu je glomerulus, proximální a distální tubulus a Henleova klička. Všechny tyto součásti jsou při DN postiženy. Nejvážněji je pak postižen glomerulus a distální tubulus.

Cytokiny a jejich role při vzniku zánětu

Role cytokinů je klíčová pro vznik zánětu. Cytokiny jsou syntetizovány buňkami imunitního systému, sloužící jako signální molekuly imunitní odpovědi a významně se podílejí na vzniku DN. Významným zánětlivým cytokinem je TNF α stimulující produkci ECM proteinů^[20]. Důležitou roli při vzniku DN má i cytokin TGF β . Mechanismem jeho působení je akumulace ECM proteinů. Po extracelulární

aktivaci se specificky váže na své receptory (TGF β R1 a TGF β R2) a tím aktivuje transkripci celé řady cílových genů (např. *Glut1*, *Thrombospondin* (*Thbs1*), *Vcam1* (z anglického „vascular cell adhesion molecule 1“))^[8, 21]. Významným regulačním cytokinem je IFN γ , který je produkován přirozenými zabíječi (z anglického „natural killer cell“ (NK)) a T-lymfocyty. Účastní se také zánětlivých procesů, které poškozují buňky ledvin^[22]. Na druhé straně bylo ukázáno, že IFN γ má pozitivní ochranný vliv na ledviny při dlouhodobé hyperglykémii^[23].

Při vzniku zánětu již byla zmíněna role chemokinů, neboli chemotaktických cytokinů, které jsou spojeny s imunitní odpovědí. Jedním z těchto chemokinů je třída CC chemokinů, které se specificky váží na CCR receptory. Do této třídy proteinů patří MIP-1 α (z anglického „macrophage inflammatory protein“), který se účastní většiny imunitních odpovědí^[24]. Dalším chemotaktickým cytokinem je osteopontin (*Spp1*), který je chemotaktickým/adhezivním faktorem pro buňky makrofágů. *Spp1* se účastní řady vážných patologických procesů, které mohou vést v konečném důsledku až k selhání ledvin^[25]. Zvýšená exprese *Spp1* byla prokázána v souvislosti s výskytem zánětu. Role tohoto cytokinu byla potvrzena i ve spojitosti s jinými závažnými patologickými stavy ledvin, jako jsou albuminurie, glomerulonefrie a mesangiální expanze^[25b]. Buňky makrofágů se přímo podílejí na poškození jak glomerulů, tak tubulů^[25c].



2.3.2.4 Glomeruloskleróza a tubulointersticiální fibróza

Při DN je glomeruloskleróza způsobena hromaděním ECM proteinů v mesangiu, zejména kolagenu typu I, II, IV a fibronektinu^[25a]. Hromaděním kolagenu vzniká v důsledku zvýšené aktivity mesangiálních buněk, resp. snížené degradační

schopnosti metaloproteinů. Na vzniku glomerulosklerózy se podílejí i buňky makrofágů^[25c]. Glomeruloskleróza může být vyvolána i jiným mechanismem než je apoptóza. Dalším dějem, při kterém dochází ke glomeruloskleróze, jsou změny v bazální membráně nefronů a ve funkci podocytů. Podocyty jsou epiteliální buňky na vnější straně bazální membrány, které regulují velikost filtračních štěrbin glomerulů. Jedním z klíčových proteinů podocytů je podocin, který je kódován genem *Nphs2*. Tento integrální protein vlásenkové struktury propojuje podocyty a je spojen s celou řadou dalších proteinů (např. nefrin, cadherin; Obrázek 5.)^[1, 26]. Podocin hraje významnou roli při rozvoji DN^[26b, 27].

Dalším důležitým faktorem pro rozvoji DN je glykoprotein kódovaný genem *Thbs1*. Za normálních, nepatologických, podmínek THBS1 zastává v buňce mnoho různých funkcí, kterými jsou fagocytóza, adheze a chemotaxe^[8, 21b]. Zvýšená exprese *Thbs1* koreluje se zvýšenou aktivitou TGFβ-procytokinového komplexu a rozvojem glomerulosklerózy a tubulointersticiální fibrózy. Při zánětu dochází ke zvýšení exprese *Thbs1* především v oblasti tubulárních buněk a méně v zánětlivých intersticiálních myoblastech a v buňkách makrofágů^[21b].

3. Cíl práce

Cílem této práce bylo stanovit změny v ledvinné tkáni myších samců v závislosti na genotypu (*wt* a *Hif1 α* ^{+/-} mutantů), kteří byli vystaveni působení diabetu. Naše hypotéza je, že diabetes mellitus ovlivňuje expresi genů v tkáni ledvin, a že tyto expresní změny jsou pak klíčové při vzniku komplikací spojených s DN. Dále předpokládáme, že HIF1 α metabolická dráha je klíčovým faktorem při rozvoji DN.

Specifické cíle:

- Sledovat morfologické změny v ledvinné tkáni po 35 denním působení diabetu na myší samce pomocí histologické analýzy.
- Analyzovat expresi vybraných genů HIF1-regulační dráhy (*Cxcr4*, *Glut1*, *MIP-1 α* , *Nphs2*, *Spp1*, *Thbs1*, *TNF α* , *Vcam1*) v kůře a ve dřeni ledvin použitím metody relativní kvantitativní polymerázové řetězové reakce. Dále vyhodnotit odchylky *wt* kontrol od *Hif1 α* ^{+/-} mutantního jedince, který měl na jedné alele nahrazenou kódující oblast pro *Hif1 α* za gen kódující rezistenci na neomycin.

4. Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Komerční soupravy

- SYBR®Green JumpStart™ Tag ReadyMix™ , *Sigma*
- RevertAid H Minus First Strand cDNA synthesis Kit, *Fermentas*
- JumpStart™ Taq DNA Polymerase, *Sigma*

4.1.2 Primery

Seznam použitých primerů je uveden v následující Tabulce 1.

Tabulka 1. Seznam použitých primerů

(F- z anglického „forward“, R- z anglického „reverse“)

Gen	Sekvence (5' → 3')	účel
<i>Cxcr4</i> -F	TGGAACCGATCAGTGTGAGT	qPCR
<i>Cxcr4</i> -R	GGGCAGGAAGATCCTATTGA	qPCR
<i>Glut-1</i> -F	GGATCCCAGCAGCAAGAAG	qPCR
<i>Glut-1</i> -R	CCAGTGTTATAGCCGAAGTGC	qPCR
<i>Hif1α</i> -F	TGTAGTCTCCTGCTAAAAG	PCR
<i>Hif1α</i> -R	TTATTCGAGTTAAGACAAAC	PCR
<i>Hprt1</i> -F	GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG	qPCR
<i>Hprt1</i> -R	CCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT	qPCR
<i>MIP-1α</i> -F	TGCCCTTGCTGTTCTTCTCT	qPCR
<i>MIP-1α</i> -R	GTGGAATCTTCCGGCTGTAG	qPCR
<i>Neomycin</i> -F	ACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTG	PCR

<i>Neomycin-R</i>	GTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAG	PCR
<i>Nphs2-F</i>	GACACCTATCACAAGGTTGA	qPCR
<i>Nphs2-R</i>	CCATGCGGTAGTAGCAGACA	qPCR
<i>Spp1-F</i>	CCCGGTGAAAGTGACTGATT	qPCR
<i>Spp1-R</i>	TTCTTCAGAGGACACAGCATTC	qPCR
<i>Thbs1-R</i>	GCAACAGGAACAGGACACCTA	qPCR
<i>Thbs1-F</i>	CACCTCTCCGGGTTACTGAG	qPCR
<i>TNFα-R</i>	CAGGCTGGTAGGAGTCTTTCTT	qPCR
<i>TNFα-F</i>	CGGCAAGAAATGCAGGAG	qPCR
<i>Vcam-1-F</i>	TGGTGAAATGGAATCTGAACC	qPCR
<i>Vcam-1-R</i>	CCCAGATGGTGGTTTCCTT	qPCR

4.1.3 Chemikálie

- agarosa, DPX „*Mountant for histology*“ směs distyrenu, změkčovače (dibutylftalát) a xylenu (z anglického „distyrene, plasticizer, xylene“), ethidium bromid, isopropanol, streptozocin (STZ), xylén, disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), dimehtylsulfoxid (DMSO), 10mM citrátový pufr, voda bez DNas a RNas, paraformaldehyd (PFA), fosfátový pufr (PBS), *Sigma*
- dNTP Mix (10mM), GeneRuler 50 bp DNA Ladder, *Fermentas*
- „eosin G o Y“ ethanolový roztok, hematoxylin, *Bamed*
- ethylakohol, *Penta-Chem*
- RediLoad, Trizol Reagent, *Invitrogen*
- chlorid sodný, *Fishersc*
- Tris, *Sigma*

4.1.4 Enzymy

- Proteinasa K, *Sigma*
- RNasa H, *Fermentas*

4.1.5 Složení použitých roztoků

- Lyzační pufr:
 - 50 mM Tris, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, pH 8,0
- Elektroforetický pufr 0,5x TBE:
 - 45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA, pH 8,0
- PBS pufr:
 - 10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4

4.1.6 Laboratorní přístroje a zařízení

- Centrifuga Z216 MK(stolní, chlazená), *Hermle*
- Elektroforéza Mini Gel System B1, *Owl*
- Glukometr Contour TS, *Bayer*
- Hybridizační pec ProBlot, *Labnet*
- Homogenizátor TissueRuptor, *Qiagen*
- Mikrovlnná trouba MCE30, *Hitachi*
- Microtome Leica RM2255, *Leica*
- Pipety P39604P, *Gilson, Labnet*
- Spektrofotometr N1000, *NanoDrop*
- Systém pro qPCR LightCycler®480, *Roche*
- Systém pro zobrazení a kvantifikaci agarosových gelů UVT-28M, *Herolab/Olympus*
- Termocykler BIOER, *Genepro*
- Termoblok BioTDB-100, *Labnet*
- Termostat Mini Incubator 5110-230V, *Labnet*
- Vortex MIXER S0200, *Labnet*
- Analytické váhy 154AI, *Bel engineering*
- Vodní lázeň NB-303, *N-Biotek*
- Elektrická ploténka OTS 40, *Medite*
- Stereomikroskop SMZ 1500, *Nikon*
- Mikroskop Eclipse 50i, *Nikon*
- pozn. veškeré použité laboratorní nádoby i roztoky jsou sterilní a bez RNas a DNas

4.2 Metody

4.2.1 Experimentální myší model

4.2.1.1 *Charakteristika modelového organismu*

Experimentální práce se zvířaty proběhla v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. ve znění jeho následných novel a vyhlášky č. 39/2009 Sb. K pokusům byli použiti myši samci inbredního FVB kmene (číslo 207, Charles River) ve věku 7-9 týdnů. Křížením divokého kmene (z anglického „wild type“ (*wt*, *Hif1α*^{+/+})) s heterozygotními mutanty *Hif1α*^{+/-} s *Hif1α*^{tm1jhu} vyřazenou alelou [28] na FVB geneticky definovaném pozadí byly generovány *Hif1α*^{+/-} a *wt* myši. Heterozygotní *Hif1α* deficientní myši jsme získali od Gregga L. Semenzky z Johns Hopkins University School of Medicine, USA. Chybějící *Hif1α* alela u heterozygotních *Hif1α* mutantů byla detekována pomocí genotypizace.

4.2.1.2 *Izolace DNA a určení genotypu*

Každý vrh nově narozených myší je nutné genotypovat, abychom oddělili heterozygotní mutanty *Hif1α* od *wt*.

Pro izolaci DNA použijeme cca 2 mm ocasu od každého jedince, získanou tkáň lyzujeme a ze získaného lyzátu vysrážíme DNA. Nejprve, získanou tkáň přeneseme do mikrozku mávek a přidáme 600 µl lyzačního pufru a 12,5 µl proteinasy K [20 mg/ml]. Takto připravené vzorky umístíme do rotační hybridizační pece a necháme přes noc inkubovat při 55°C. Lyzované vzorky promícháme a poté centrifugujeme 10 min/14000g, 20°C. Supernatant přeneseme do čisté sterilní mikrozku mávky a přidáme 600 µl isopropanolu. Pomalým převrácením mikrozku mávky docílíme vysrážení DNA. Peletu DNA odsolíme přidávkem 500 µl 70% (w/v) ethanolu a poté ji sušíme v inkubátoru při teplotě 37°C po dobu 20 min. Přidávkem 100 µl vody k peletě necháme DNA rozpouštět v termostatu při 55°C přes noc. Koncentraci DNA stanovíme spektrofotometricky (při vlnové délce 230nm) pomocí počítačového programu ND-1000 V.3.3.0. Amplifikaci DNA provádíme v celkovém reakčním objemu 25 µl pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR), podle složení reakční směsi, která je uvedena v Tabulce 2. Sekvence „primerů“ použitých na genotypizaci jsou uvedeny v Tabulce 1., ve sloupci „účel“ mají uvedeno PCR.

Tabulka 2. Složení PCR reakční směsi

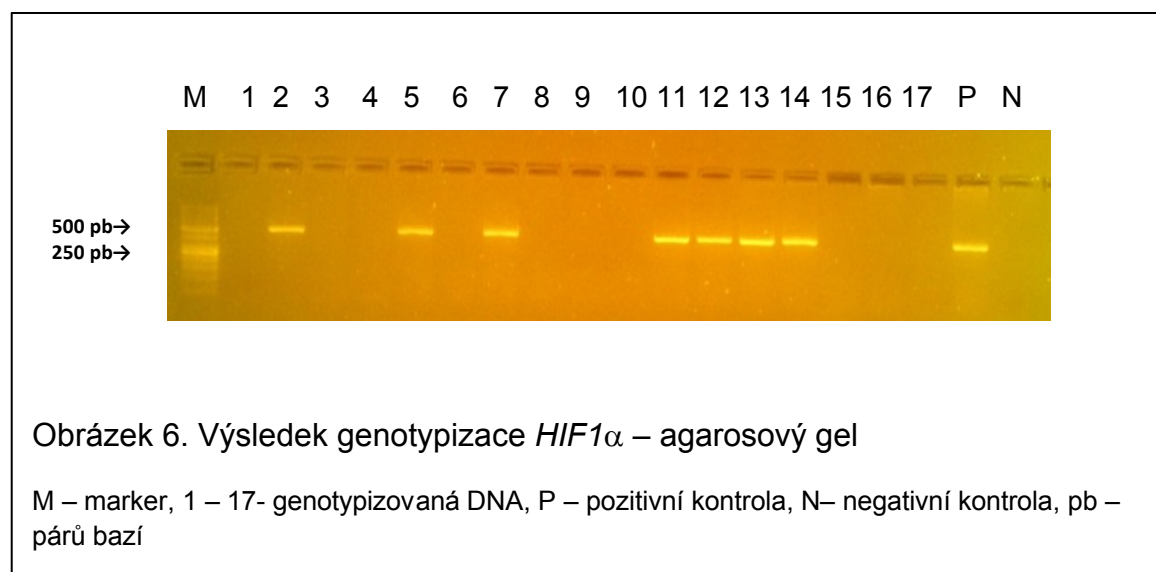
Složka	V [μl]
10x PCR pufr	2,5
MgCl ₂ (15 mM)	1,5
dNTP (10 mM)	0,5
Rediload	2,5
primer 1 (10 μM)	1
primer 2 (10 μM)	1
DMSO	1,25
JumpStart TagDNA Polymerasa (2,5 u/μl)	0,15
H ₂ O	13,5
DNA	1,0

Mikrozkumavky s reakční směsí umístíme do termocykleru a provedeme PCR dle reakčního schématu uvedeného v Tabulce 3.

Tabulka 3. Schéma PCR reakce

Krok	Teplota [°C]	Doba [min]	Opakování
aktivace polymerasy	95	5	1
denaturace DNA	95	0,5	
nasedání „primerů“	63	0,5	34
elongace	72	0,5	
konečná elongace	72	5	1

Detekci produktů PCR reakce provádíme gelovou elektroforézou v TBE pufru v prostředí 2% (w/v) agarosového gelu přidavkem 10 μ l ethidia bromidu (0,01 μ l/ml). Do první jamky nanese 5 μ l GeneRuler 50 bp DNA Ladderu a do dalších jamek pipetujeme po 10 μ l PCR reakční směsi. Elektroforéza probíhá při konstantním napětí 130 V. PCR produkty vizualizujeme pomocí přidaného ethidia bromidu pod UV světlem. Jeden obrázek elektroforetického gelu ilustrující výsledek genotypizace je zobrazen na Obrázku 6.



4.2.1.3 **Navození diabetu**

Pro navození diabetu použijeme myši samce ve věku 7 – 9 týdnů. Streptozocin injikujeme intraperitoneálně v množství 100 mg/kg tělesné hmotnosti rozpuštěný v 10 mM citrátovém pufru ve dvou dávkách a to tak, že druhá injekce je aplikována jeden týden po injekci první. Dva týdny po aplikaci první injekce STZ změříme glukometrem hladinu glukosy v kapce krve odebrané z hlavní ocasní tepny. Za diabetické jedince jsou považováni ti, u nichž je hladina glukosy větší nebo rovno 13,9 mmol/l.

4.2.2 **Odběr ledvin**

Vybrané jedince usmrtíme cervikální dislokací a preparujeme ledviny. Ledvinu použitou na přípravu histologických řezů okamžitě fixujeme 24 h/ 4°C ve 4% PFA

v PBS pufru. U druhé ledviny použité na izolaci RNA oddělíme pod mikroskopem dřeň a kůru pomocí skalpelu.

4.2.3 Izolace RNA

K tkáni přidáme 1 ml Trizol Reagentu a důkladně ji homogenizujeme pístovým homogenizátorem s elektrickým pohonem. Po homogenizaci vzorky 10 min inkubujeme při laboratorní teplotě, přidáme 0,2 ml chloroformu (1/5 objemu Trizol Reagentu) a důkladně promícháme. Opět 5 minut inkubujeme při laboratorní teplotě a následně centrifugujeme 15 min/14000g, 4°C. Opatrně odebereme horní (vodnou) fázi, aniž bychom se dotkli špičkou fázového rozhraní, a přeneseme ji do nové čisté a sterilní mikrozkušavky. K vodné fázi přidáme 500 µl isopropanolu (1/2 objemu Trizol Reagentu) a převrácením mikrozkušavky srážíme RNA. Následuje centrifugace 15 min/14000g, 4°C. Odsajeme supernatant a k peletě přidáme 0,5 ml 75% (v/v) ethanolu a peletu důkladným promícháním a následnou centrifugací 5 min/7500g, 4°C omyjeme. Omytí pelety ethanolem opakujeme třikrát. Na závěr odebereme ethanol a peletu necháme oschnout v inkubátoru při 37°C po dobu 20 min. Získaná RNA je rozpuštěna v případě izolace z kůry ledvin ve 100 µl a z dřene v 50 µl vody. Takto připravené vzorky skladujeme při -80°C.

4.2.4 Reverzní transkripce

Koncentraci RNA v jednotlivých vzorcích stanovíme spektrofotometricky (při vlnové délce 230nm) pomocí počítačového programu ND-1000 V.3.3.0. Poté vypočteme objem RNA, který musíme přidat do reakce RT, aby celkové množství RNA, které je přepisováno do cDNA, bylo 1 µg/ maximálně 10 µl, dále přidáme 1 µl „primeru“ oligo(dT)₁₈ a 1 µl „primeru“ náhodných hexametrů. Takto připravenou směs inkubujeme v termocykleru při 65°C po dobu 5 min. Vzorky ochladíme na ledu a přidáme 4 µl 5x reakčního pufru, 1 µl RiboLock RNasy Inhibitoru (20 u/µl), 2 µl dNTP Mix (10 mM) a 1 µl RevertAid H Minus M-MuLV Reverzní Transkripty (200u/µl). Tuto reakční směs o konečném objemu 20 µl opět vložíme do termocykleru a necháme proběhnout reakci při teplotě 42°C po dobu 60 min s následnou 5 minutovou inkubací při teplotě 70°C.

V reakční směsi degradujeme zbytky RNA přidavkem 0,6 µl RNázy H a necháme inkubovat 20 min při 37°C. Vzorky cDNA uchováváme při -80°C.

4.2.5 Kvantitativní PCR v reálném čase

Připravená cDNA pomocí reverzní transkripce je 20x naředěná vodou. Naředěná DNA je použita jako templát pro qPCR. Reakční směs obsahuje 4 µl cDNA, 0,25 µl „primeru F“ (10 µM), 0,25 µl „primeru R“ (10 µM), 0,5 µl vody a 5 µl 2x Syber®Green JumpStart™ Tag ReadyMix™. Použité sady „primerů“ jsou uvedené v Tabulce 1., v kolonce „účel“ mají uvedeno qPCR. Reakci qPCR provedeme v přístroji LightCycler dle schématu uvedeného v Tabulce 4.

Tabulka 4. Schéma qPCR

Krok	Teplota [°C]	Doba [s]	Počet opakování
aktivace polymerasy	94	120	1
denaturace	94	15	40
nasedání primerů + elongace	60	60	40

Hodnoty C_q („*crossing point*“) určíme pomocí počítačového programu LightCycler®480 metodou druhé derivace. Z těchto hodnot vypočítáme průměrnou hodnotu C_q jednotlivých biologických a technických replikátů (v našem případě se jednalo o duplikáty). Tuto hodnotu normalizujeme ke kontrolnímu genu (v našem případě *Hprt1*, z anglického „*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*“) následujícím výpočtem $\Delta C_q = C_{q_{GEN}} - C_{q_{Hprt1}}$. Tyto hodnoty porovnáme mezi diabetickými a kontrolními myšmi pomocí nepárového t-testu s využitím počítačového programu GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Relativní expresi sledovaného genu určíme na základě jeho efektivity (E) při qPCR a jeho diferenci (Δ) přechodového bodu (C_q) experimentálního vzorku vůči kontrole podle vzorce 1^[29].

$$\text{relativní exprese} = \frac{E_{\Delta C_q \text{ gen}} (\text{průměr kontrola} - \text{průměr EXP})}{E_{\Delta C_q \text{ Hprt1}} (\text{průměr kontrola} - \text{průměr EXP})} \quad (1)$$

(EXP (experimentální) - diabetický *wt*, diabetický *Hif1α^{+/-}*, a nediabetický *Hif1α^{+/-}*, kontrola - nediabetický *wt*).

Z biologických a technických replikátů vypočítáme standardní odchylku.

4.2.6 Histologická analýza

4.2.6.1 Příprava řezů

Ledviny fixované ve 4% PFA v PBS pufru nejdříve omyjeme roztokem PBS pufru, abychom odstranili veškeré fixativum z tkáně. Poté provádíme převedení tkáně ethanolovou řadu (25%, 50% a 70% (v/v) ethanol) do 70% ethanolu. Na převedení vzorků do xylenu a prosycení parafinem použijeme odvodňovací tkáňový automat Leica ASP 200. Takto prosycené vzorky ledvin zalijeme do parafinu pomocí zalévacího automatu Leica EG 1150. Parafinový bloček krájíme pomocí Microtomu Leica RM2255 na řezy o tloušťce 8 μm . Jednotlivé řezy přeneseme na vodní hladinu vytemperovanou na 39°C. Po dokonalém vypnutí řezů je opatrně přeneseme na podložní skla. Konečná fixace řezů na sklech se provádí inkubací při 42°C přes noc.

4.2.6.2 Barvení a fixace řezů

Před barvením řezů je nejprve nutné tyto řezy zbavit parafinu postupem uvedeným v Tabulce 5.

Tabulka 5. Schéma odparafinování řezů

Číslo kroku	Činidlo (% v/v)	Doba setrvání v lázni [min]
1	xylén	15
2	100% ethanol	5
3	96% ethanol	5
4	90% ethanol	5
5	80% ethanol	3
6	70% ethanol	5
7	destilovaná voda	∞

Poté řezy barvíme dle schématu, které je uvedeno v Tabulce 6.

Tabulka 6. Schéma barvení H-E

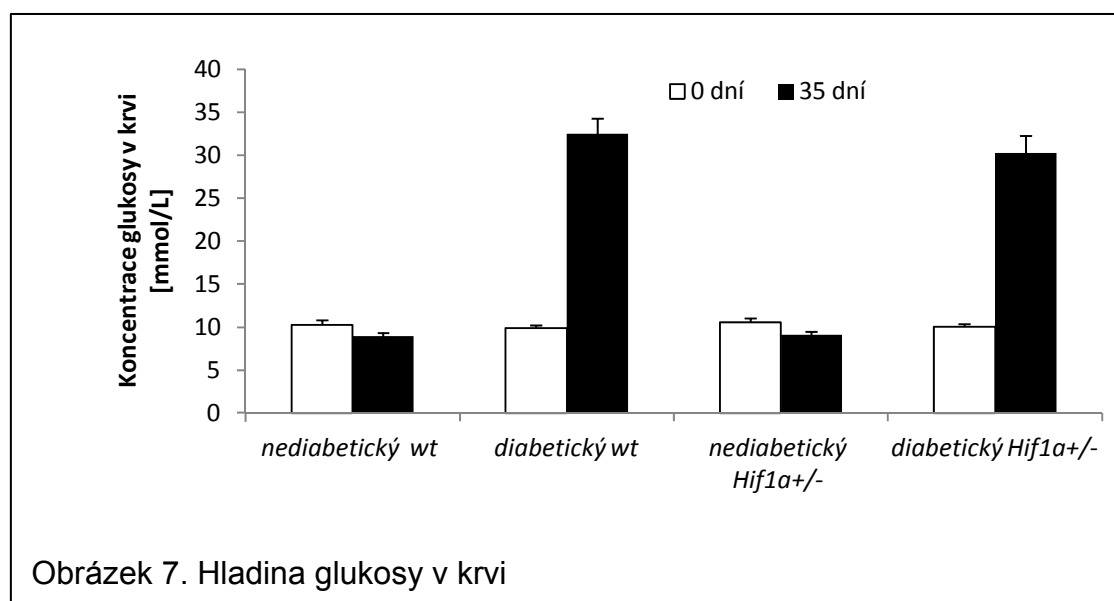
Číslo kroku	Činidlo	Doba setrvání v lázni
1	hematoxilin	40 s
2	tekoucí voda	5 min
3	kyselý ethanol	5 s
4	voda z vodovodu	5 min
5	eosin	5 s
6	destilovaná voda	10 s
7	70% ethanol	10 s
8	80% ethanol	10 s
9	90% ethanol	10 s
10	96% ethanol	10 s
11	100% ethanol	5 min
12	xylén	3 min
13	xylén	3 min

Po krocích č. 2, 4, 6 a 7 kontrolujeme probarvení řezů pod mikroskopem. Pokud nejsou dostatečně probarveny, opakujeme předchozí kroky, dokud nedojde k dokonalému probarvení jader a cytoplazmy. Po odvodnění tkání (krok 7 až 13) připravíme trvalé preparáty nanesením DPX a přiložením krycího skla.

5. Výsledky

5.1 Uvedení do diabetu

32 myších samců ve věku 7 – 9 týdnů bylo v závislosti na genotypu (*wt* a *Hif1 α ^{+/-}*) rozděleno do dvou skupin po 16 samcích. Genotyp myších jedinců byl určen metodou PCR z DNA izolované z ocasů. 8 samců od každého genotypu bylo uvedeno do diabetu. Diabetes byl vyvolán dvěma intraperitoneálními injekcemi STZ, v množství 100 mg/kg hmotnosti myši, aplikovanými po týdně. Hladina glukosy v krvi byla měřena v den 0, dva týdny po aplikaci první injekce (z důvodu potvrzení diabetu) a 5 týdnů od zjištění diabetu. Takto byly vytvořeny čtyři skupiny po osmi jedincích (diabetický *wt*, nediabetický *wt*, diabetický *Hif1 α ^{+/-}*, nediabetický *Hif1 α ^{+/-}*). Aplikovaná dávka STZ vyvolala u obou skupin zvířat (*wt*, *Hif1 α ^{+/-}*) zvýšení hladiny glukosy v krvi nad 13,9 mmol/l. Tyto hodnoty jsou považovány za diabetické.

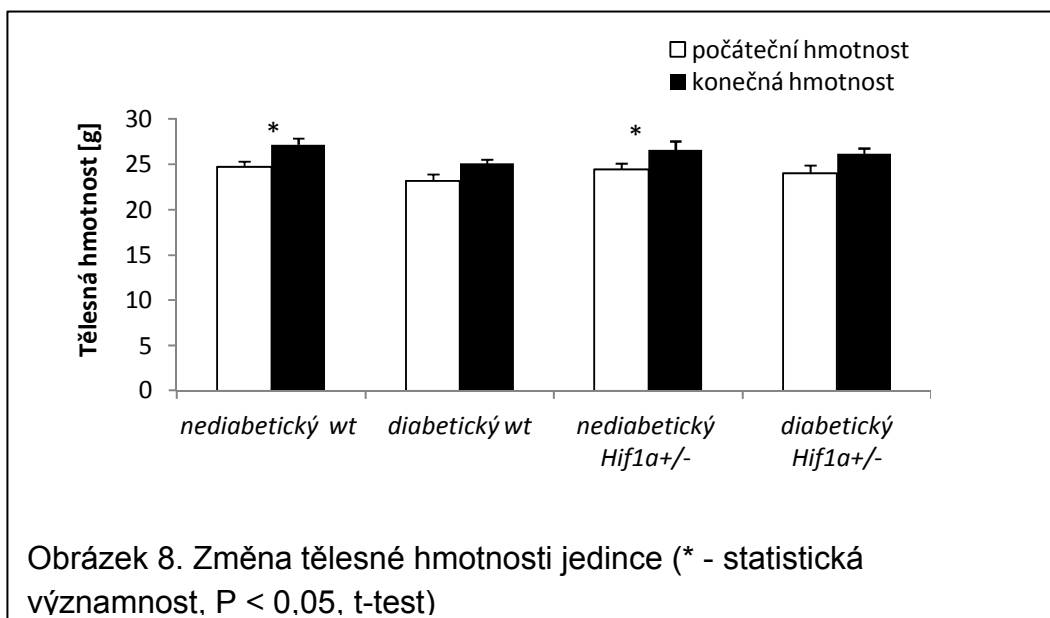


5.2 Změny ve fenotypu myšího modelu

Změna fenotypu byla posuzována ze dvou hledisek a to:

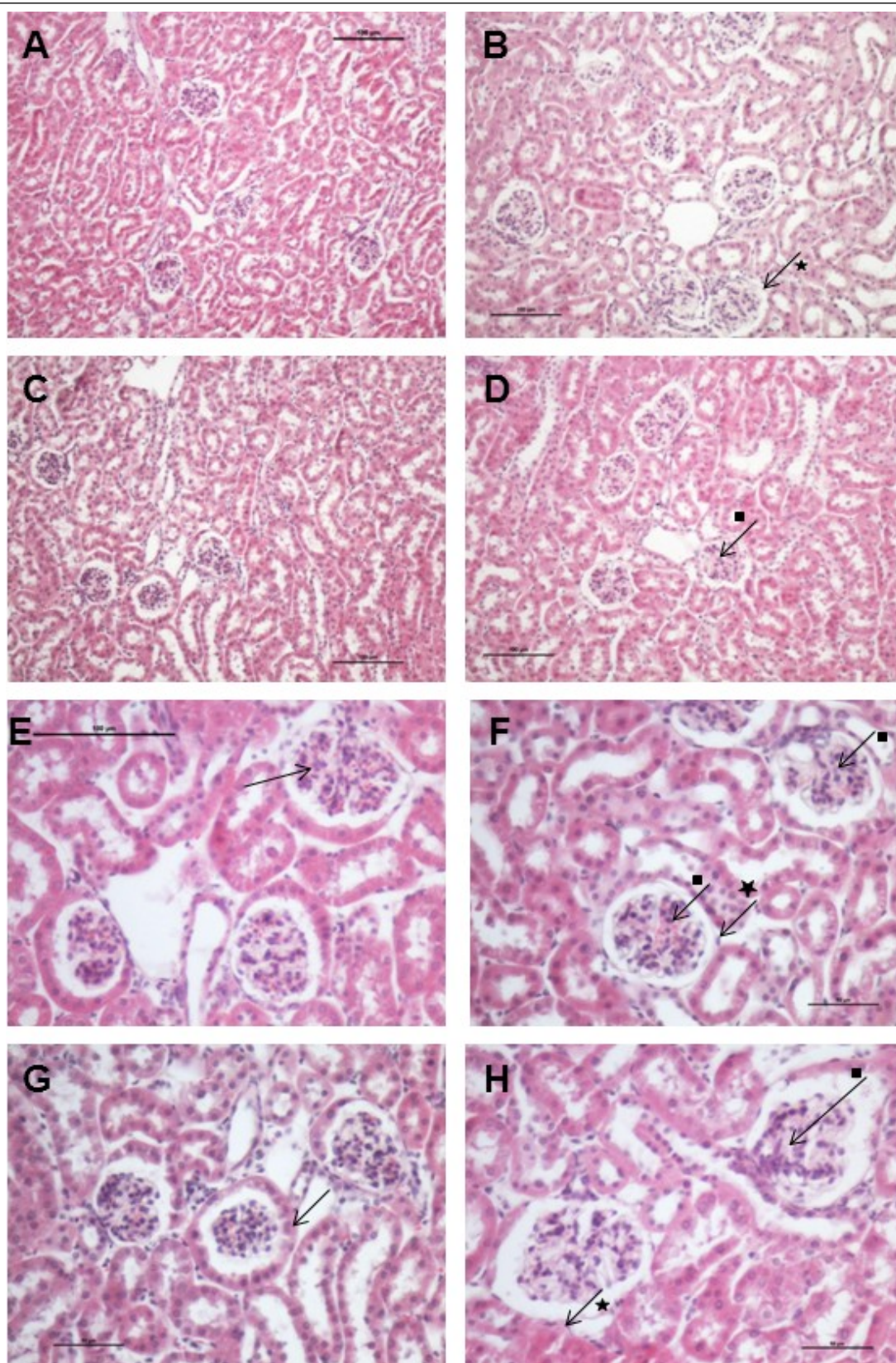
A) Vliv diabetu na hmotnost jedince

Myši samci byli zváženi v den 0 a po pěti týdnech v diabetu, bezprostředně před usmrcením. Vliv diabetu na přírůstek hmotnosti je znázorněn na Obrázku 8. Nediabetické skupiny jedinců se vyznačovaly signifikantním nárůstem hmotnosti ($P < 0,05$, t-test). Naproti tomu jedinci diabetických skupin tento nárůst hmotnosti nevykazovali.



B) Vliv diabetu na morfologii ledvin

Ledviny byly po fixaci 4% PFA v PBS a následném odvodnění zality do parafínových bločků. Histologické preparáty byly připraveny nakrájením bločků na 8 μm silné řezy, které byly obarveny H-E. Morfologie ledvin a případné poškození bylo hodnoceno mikroskopicky. Byla posuzována expanze ECM a tloušťka kapsuli glomeruli. Z každé skupiny byly prokrájeny ledviny tří myších samců. Výsledky histologické analýzy vždy jednoho zástupce jsou patrné z Obrázku 9., kde na A – D jsou zobrazeny řezy nejprve s menším zvětšením, na kterých bylo pozorováno celkové poškození glomerulů ledviny, a E – H zobrazují ve větším detailu 2 – 3 glomeruly, na kterých jsou identifikovány morfologické změny (označeny šipkou).



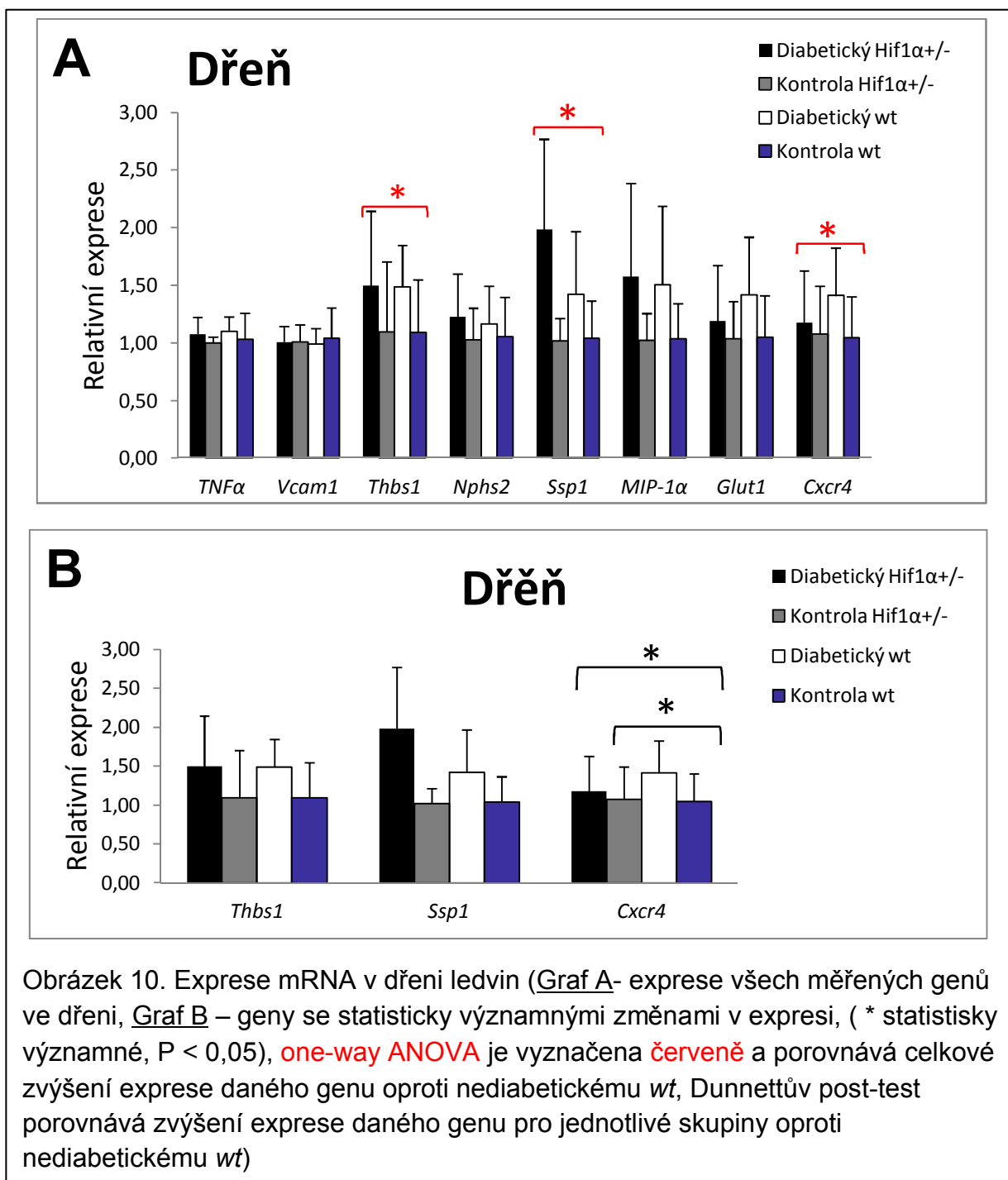
Obrázek 9. Histologické řezy ledvinou (A,E – nediabetický wt; B,F – diabetický wt; C,G – nediabetický Hif1 $\alpha^{+/-}$; D,H – diabetický Hif1 $\alpha^{+/-}$; A – D – zvětšení 200x, E – H – zvětšení 400x, šipkou je označena sledovaná oblast ★ poškození capsula glomeruli, ■ expanze ECM proteinů).

Na Obrázku 9. A a E je zobrazen řez ledvinou nediabetického *wt*, který sloužil, jako kontrola a se kterým byly ostatní řezy srovnávány, protože nebyl vystaven působení mutace ani diabetu. Obrázky 9. B a F představují řezy ledvinou diabetického *wt*, u něhož byla velmi patrná akumulace ECM (označeno šipkou, Obrázek 9.). Na Obrázku 9. C a G je zobrazen řez ledvinou nediabetického *Hif1 α* mutanta, která ve srovnání s kontrolou (nediabetickým *wt*) nejevila žádné morfologické odlišnosti. Na řezech 9. D a H je ledvina diabetického *Hif1 α ^{+/-}* mutanta, kde je patrné ztenčení Bowmannova pouzdra a svraštění vlásečnic uvnitř ve srovnání s kontrolním nediabetickým *wt*. Ledviny diabetických *Hif1 α ^{+/-}* mutantů vykazovaly stejný stupeň poškození jako ledviny diabetického *wt* (řezy B a F). U obou diabetických skupin bylo patrné zvýšené nahromadění ECM proteinů. Některé glomeruly vykazovaly dokonce známky apoptózy, kdy nebylo možné rozlišit jednotlivé části glomerulu, protože nebyly již přítomny.

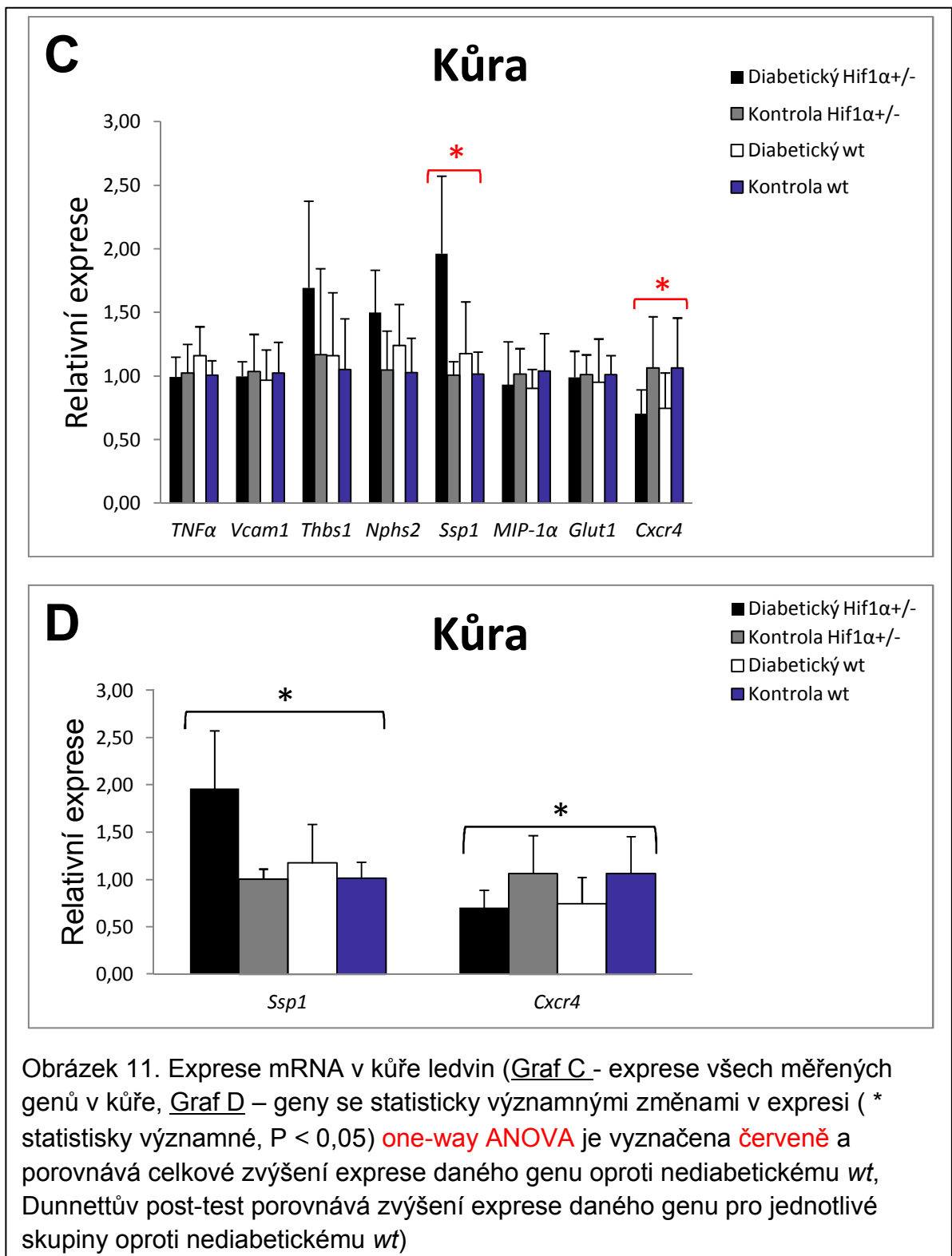
5.3 Změny v genové expresi

MUDr. Silvie Rajnochová-Bloudíčková, Ph.D. rozdělila pod stereomikroskopem ledviny na kůru a dřeň. V každé této části byla sledována exprese cílových genů (*Cxcr4*, *Glut1*, *MIP-1 α* , *Nphs2*, *Spp1*, *Thbs1*, *TNFA*, *Vcam1*). Z kůry a z dřene byla izolována RNA, která byla přepsána pomocí reverzní transkripce do cDNA. Získaná cDNA byla použita k měření genové exprese. Změny genové exprese byly stanoveny pomocí metody qPCR, hodnoty s využitím intekalačního činidla Syber®Green. Hodnoty Cq byly normalizovány ke kontrolnímu genu *Hprt1* (Δ Cq). Tento gen byl vybrán, protože jeho exprese ve všech vzorcích byla stejná. Získané výsledky byly statisticky analyzovány pomocí neparametrického testu one-way ANOVA pro celkovou sadu dat a Dunnettovým post-testem pro porovnání jednotlivých skupin. Výsledky exprese jednotlivých genů byly vztaženy ke kontrolní skupině, nediabetickému *wt*.

Na Obrázku 10. je zobrazená exprese ve dřeni ledvin. V Grafu A je znázorněna relativní exprese všech genů, která byla normalizována ke kontrolnímu genu *Hprt1* a k expresi kontrolní skupiny (nediabetický *wt*). V Grafu B je zobrazena relativní exprese genů, které vykazovaly statisticky významnou změnu ve srovnání s kontrolní skupinou (nediabetickými *wt*). Největší zvýšení exprese mRNA bylo u samců vystavených diabetu zaznamenáno v expresi genu *Cxcr4* ($P < 0,0002$).



Druhým genem, vykazujícím zvýšení exprese u těchto samců, byl gen *Ssp1* ($P < 0,0042$) a posledním genem, který vykazoval zvýšenou expresi mRNA ve srovnání s kontrolní skupinou byl gen *Thbs1* ($P < 0,0347$). Na Obrázku 11., (Graf C) je zobrazená relativní exprese mRNA všech měřených cílových genů v kůře ledvin. Expres mRNA byla opět porovnávána ke kontrolní skupině nediabetického wt. Statisticky významný rozdíl v expresi byl prokázán pouze u dvou genů: *Ssp1* a *Cxcr4*. Změny expresí těchto genů jsou znázorněny v Grafu D. Největší zvýšení relativní exprese mRNA bylo u genu *Cxcr4* ($P < 0,027$), gen *Ssp1*



Obrázek 11. Expres mRNA v kůře ledvin (Graf C - exprese všech měřených genů v kůře, Graf D – geny se statisticky významnými změnami v expresi (* statisticky významné, $P < 0,05$) **one-way ANOVA** je vyznačena červeně a porovnává celkové zvýšení exprese daného genu oproti nediabetickému wt, Dunnettův post-test porovnává zvýšení exprese daného genu pro jednotlivé skupiny oproti nediabetickému wt)

vykazoval také statisticky významné změny v porovnání s kontrolní skupinou ($P < 0,0197$).

6. Diskuze

Diabetes mellitus je chronické onemocnění, které je spojeno s řadu vážných komplikací. Jednou z těchto komplikací je DN, která je velmi častou příčinou selhání ledvin. DN je chronickou komplikací obou základních typů diabetu^[1, 5a]. V tomto projektu jsme se zaměřili na analýzy buněčných a molekulárních změn v ledvinách myšího modelu, které jsou způsobeny diabetickým prostředím. Experimentální zvířata byla vystavena diabetu 35 dnů, což odpovídá časnému, krátkodobému zatížení diabetem. Časný vliv diabetu odpovídal také rozsahu histologických změn v ledvinné tkáni, které jsme identifikovali. Patrná akumulace ECM a nekompaktnost Bowmanova pouzdra glomerulů, které jsme detekovali v našem experimentálním modelu, odpovídala 1. stupni poškození ledvin^[2].

Časné morfologické změny v ledvinách u DN jsou spojovány s hyperglykemií a následnou hypoxií^[9]. Hlavním regulačním faktorem odpovědi na hypoxii je transkripční faktor HIF1 α ^[13, 21a]. Z tohoto důvodu byl v této studii použit myší model, který měl na jedné alele nefunkční gen *Hif1 α* , který byl blokován inzercí genu kódujícího resistenci k neomycinu. Vliv *Hif1 α ^{+/-}* genotypu na morfologii ledviny nebyl v tomto časném stádiu působení diabetu pozorován. Tato skutečnost je zřejmě dána tím, že mutantní jedinec je heterozygot a „nefunkčnost“ jedné alely je dostatečně kompenzována druhou funkční alelou.

Naše analýzy molekulárních změn na úrovni mRNA ukázaly významný vliv diabetického prostředí na genovou expresi v ledvinách. Při časném diabetu jsou změny v genové expresi specifickou odpovědí jednotlivých částí nefronu, převážně podocytů, na stresové podmínky vyvolané působením diabetu. V našem experimentálním modelu jsme detekovali významné změny v expresi *Cxcr4*, *Spp1* a *Thbs1* genů, které jsou regulovány HIF1 metabolickou dráhou a které při změněné expresi ovlivňují funkci ledvin^[18]. Při analýze změn genové exprese v kůře a dřeni ledvin jsme zjistili zvýšenou expresi *Cxcr4* pouze v dřeni diabetických *wt* samců. Zvýšení exprese toho genu je spojováno s imunitní odpovědí organismu na zánět. Protein kódovaný tímto genem je receptor pro chemokin C-X-C motivu a je nejvíce exprimován v podocytech glomerulů^[18]. U diabetických *Hif1 α ^{+/-}* mutantů byla exprese *Cxcr4* mírně zvýšená v porovnání

s kontrolní skupinou, ale tato změna nebyla statisticky významná. Tato zhoršená „neodpovídnost“ by mohla být vysvětlena změnou regulací transkripčního faktoru HIF1 u *Hif1α*^{+/-} mutantů. Dalším genem se změnami exprese v diabetických ledvinách, který jsme identifikovali, byl gen *Spp1*. Zvýšená exprese tohoto cytokinu (*Spp1*), který ovlivňuje buňky makrofágů, je opět spojována s imunitní odpovědí na přítomný zánět. Možná role tohoto cytokinu v souvislosti s rozvojem DN byla již popsána v předchozí studii na myším modelu^[30]. Výsledky z této studie korelují s našimi výsledky. Role *Spp1* v souvislosti s mesangiální expanzí byla popsána na diabetickém mutantním myším modelu s vyřazeným *Spp1* genem^[25b]. U diabetického *Spp1*^{-/-} mutantu nedocházelo k mesangiální expanzi v ledvinné tkáni na rozdíl od diabetického *wt*. Expanze ECM proteinů v diabetických ledvinách byla detekována také v našem experimentálním modelu (Obrázek 9.). Mesangiální expanze korelovala se zvýšenou expresí *Spp1* genu jak v kůře, tak i ve dřeni ledvin (Obrázek 10. a 11.). Exprese *Spp1* je regulována TGFβ^[31], který je přímo regulován HIF1α^[32]. *Spp1* je tedy regulován nepřímo HIF1α.

Dalším důležitým faktorem pro rozvoj DN je glykoprotein THBS1. Exprese *Thbs1* byla zvýšena pouze v dřeni ledvin (Obrázek 10.). Zvýšená exprese *Thbs1* byla prokázána ve spojitosti s rozvojem DN u diabetických pacientů^[9a]. Výsledky těchto studií se shodují s námi naměřenými změnami v expresi tohoto genu. Role *Thbs1* byla studována především v souvislosti s TGFβ, který pak společně s *Thbs1* tvoří TGFβ-procytokinový komplex. Tento komplex má klíčovou roli při rozvoji DN^[7, 9a, 33].

7. Souhrn

Tato práce byla zaměřena na posouzení změn časného vlivu diabetu mellitu a s ním spojenou hypoxií na ledviny myších samců. Nejprve jsme se zaměřili na posouzení morfologických změn v ledvinné tkáni mezi nediabetickými a diabetickými *wt* a *Hif1α^{+/-}* myšími mutanty. Detekovali jsme zřejmé prvotní morfologické změny spojované s DN mezi diabetickými a nediabetickými jedinci. Na základě morfologických analýz nebyl patrný vliv genotypu *Hif1α^{+/-}* ve srovnání s *wt*.

V druhé části naší práce jsme se zaměřili na stanovení změn exprese cílových genů (*TNFA*, *Vcam1*, *Thbs1*, *Nphs2*, *Spp1*, *MIP-1α*, *Glut1*, *Cxcr4*) v kůře a v dřeni ledvin. Metodou relativní qPCR, jsme identifikovali výrazné změny v expresi genů *Thbs1*, *Spp1* a *Cxcr4*. Zvýšení exprese *Spp1* a *Cxcr4* bylo pozorováno v kůře i ve dřeni ledvin. Oba tyto geny kódují proteiny, které se podílejí na poškození celého nefronu. Relativní exprese *Thbs1* byla zvýšena pouze ve dřeni, což naznačuje, že se podílí na poškození tubulární části nefronu.

Naše výsledky potvrzují počáteční hypotézu, že cílové molekuly HIF1 metabolické dráhy jsou významně ovlivněny diabetem mellitem a že se se účastní rozvoje DN.

8. Seznam použité literatury

- [1] D. Kerjaschki, *J Clin Invest* **2001**, 108, 1583-1587.
- [2] T. W. Tervaert, A. L. Mooyaart, K. Amann, A. H. Cohen, H. T. Cook, C. B. Drachenberg, F. Ferrario, A. B. Fogo, M. Haas, E. de Heer, K. Joh, L. H. Noel, J. Radhakrishnan, S. V. Seshan, I. M. Bajema and J. A. Bruijn, *J Am Soc Nephrol* **2010**, 21, 556-563.
- [3] Č. R., *Anatomie 2 Grada, Česká republika*, **2002**, p. 227-249.
- [4] L. Nelson, D., Cox, M., M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, United States of America, **2008**, p. 241-242.
- [5] a) J. Škrha, Lebl, Jan, Pelikánová, Terezie, Tesař, Vladimír, Andělová, Kateřina, Perušičová, Jindřiška, Bendlová, Běla, Broulíková, Alena, Cinek, Ondřej, Čechurová, Daniela, Haluzík, Martin, *Diabetologie Galén*, Praha, Česká republika, **2009**, p. 33-72, 189-193; b) V. Bartoš, Pelikánová, T., *Praktická diabetologie*, Maxdorf, **2011**, p. 382-388
- [6] B. Basha, S. M. Samuel, C. R. Triggie and H. Ding, *Exp Diabetes Res* **2012**, 2012, 481840.
- [7] K. Inoki, M. Haneda, S. Maeda, D. Koya and R. Kikkawa, *Kidney Int* **1999**, 55, 1704-1712.
- [8] B. Hohenstein, C. Daniel, B. Hausknecht, K. Boehmer, R. Riess, K. U. Amann and C. P. Hugo, *Nephrol Dial Transplant* **2008**, 23, 3880-3887.
- [9] a) F. P. Schena and L. Gesualdo, *J Am Soc Nephrol* **2005**, 16 Suppl 1, S30-33; b) A. Gugliucci, *J Am Osteopath Assoc* **2000**, 100, 621-634.
- [10] a) S. Chen, M. P. Cohen and F. N. Ziyadeh, *Kidney Int Suppl* **2000**, 77, S40-44; b) V. M. Monnier, *J Gerontol* **1990**, 45, B105-111.
- [11] a) L. Gunaratnam and J. V. Bonventre, *J Am Soc Nephrol* **2009**, 20, 1877-1887; b) M. A. Neusser, M. T. Lindenmeyer, A. G. Moll, S. Segerer, I. Edenhofer, K. Sen, D. P. Stiehl, M. Kretzler, H. J. Grone, D. Schlondorff and C. D. Cohen, *Am J Pathol* **2010**, 176, 594-607.
- [12] G. L. Wang, B. H. Jiang, E. A. Rue and G. L. Semenza, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, 5510-5514.
- [13] G. L. Semenza, *J Appl Physiol* **2000**, 88, 1474-1480.
- [14] a) G. L. Semenza, *Cell* **2001**, 107, 1-3; b) H. Zhu and H. F. Bunn, *Science* **2001**, 292, 449-451.
- [15] W. G. Kaelin, Jr. and P. J. Ratcliffe, *Mol Cell* **2008**, 30, 393-402.
- [16] M. Scharte, X. Han, D. J. Bertges, M. P. Fink and R. L. Delude, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2003**, 284, G373-384.
- [17] G. L. Semenza, *J Clin Invest* **2000**, 106, 809-812.
- [18] T. B. Huber, H. C. Reinhardt, M. Exner, J. A. Burger, D. Kerjaschki, M. A. Saleem and H. Pavenstadt, *J Immunol* **2002**, 168, 6244-6252.
- [19] H. Zhang, M. Schin, J. Saha, K. Burke, L. B. Holzman, W. Filipiak, T. Saunders, M. Xiang, C. W. Heilig and F. C. Brosius, 3rd, *Am J Physiol Renal Physiol* **2010**, 299, F91-98.
- [20] Y. Qian, E. Feldman, S. Pennathur, M. Kretzler and F. C. Brosius, 3rd, *Diabetes* **2008**, 57, 1439-1445.
- [21] a) S. Goldfarb and F. N. Ziyadeh, *Trans Am Clin Climatol Assoc* **2001**, 112, 27-32; discussion 33; b) C. Hugo, S. J. Shankland, R. H. Pichler, W. G. Couser and R. J. Johnson, *Kidney Int* **1998**, 53, 302-311; c) S. K. Park, W. S. Yang, S. K. Lee, H. Ahn, J. S. Park, O. Hwang and J. D. Lee, *Nephrol Dial Transplant* **2000**, 15, 596-604.
- [22] J. R. Schoenborn and C. B. Wilson, *Adv Immunol* **2007**, 96, 41-101.
- [23] J. Du, L. Wang, L. Liu, Q. Fan, L. Yao, Y. Cui, P. Kang, H. Zhao, X. Feng and H. Gao, *Pharmacol Rep* **2011**, 63, 1137-1144.
- [24] a) L. G. Czaplewski, J. McKeating, C. J. Craven, L. D. Higgins, V. Appay, A. Brown, T. Dudgeon, L. A. Howard, T. Meyers, J. Owen, S. R. Palan, P. Tan, G. Wilson, N. R.

- Woods, C. M. Heyworth, B. I. Lord, D. Brotherton, R. Christison, S. Craig, S. Cribbes, R. M. Edwards, S. J. Evans, R. Gilbert, P. Morgan, E. Randle, N. Schofield, P. G. Varley, J. Fisher, J. P. Waltho and M. G. Hunter, *J Biol Chem* **1999**, *274*, 16077-16084; b) M. Ren, Q. Guo, L. Guo, M. Lenz, F. Qian, R. R. Koenen, H. Xu, A. B. Schilling, C. Weber, R. D. Ye, A. R. Dinner and W. J. Tang, *EMBO J* **2010**, *29*, 3952-3966.
- [25] a) W. G. Couser and R. J. Johnson, *Am J Kidney Dis* **1994**, *23*, 193-198; b) J. Lorenzen, R. Shah, A. Biser, S. A. Staicu, T. Niranjana, A. M. Garcia, A. Gruenwald, D. B. Thomas, I. F. Shatat, K. Supe, R. P. Woroniecki and K. Susztak, *J Am Soc Nephrol* **2008**, *19*, 884-890; c) D. J. Kelly, J. L. Wilkinson-Berka, S. D. Ricardo, A. J. Cox and R. E. Gilbert, *Nephrol Dial Transplant* **2002**, *17*, 985-991.
- [26] a) S. Somlo and P. Mundel, *Nat Genet* **2000**, *24*, 333-335; b) S. K. Iyengar, K. A. Fox, M. Schachere, F. Manzoor, M. E. Slaughter, A. M. Covic, S. M. Orloff, P. S. Hayden, J. M. Olson, J. R. Schelling and J. R. Sedor, *J Am Soc Nephrol* **2003**, *14*, S195-201.
- [27] a) N. Boute, O. Gribouval, S. Roselli, F. Benessy, H. Lee, A. Fuchshuber, K. Dahan, M. C. Gubler, P. Niaudet and C. Antignac, *Nat Genet* **2000**, *24*, 349-354; b) P. Niaudet, *J Am Soc Nephrol* **2004**, *15*, 832-834.
- [28] N. V. Iyer, S. W. Leung and G. L. Semenza, *Genomics* **1998**, *52*, 159-165.
- [29] M. W. Pfaffl, *Nucleic Acids Res* **2001**, *29*, e45.
- [30] K. Susztak, E. Bottinger, A. Novetsky, D. Liang, Y. Zhu, E. Ciccone, D. Wu, S. Dunn, P. McCue and K. Sharma, *Diabetes* **2004**, *53*, 784-794.
- [31] S. B. Nicholas, J. Liu, J. Kim, Y. Ren, A. R. Collins, L. Nguyen and W. A. Hsueh, *Kidney Int* **2010**, *77*, 588-600.
- [32] G. L. Semenza, *Genes Dev* **2000**, *14*, 1983-1991.
- [33] J. E. Murphy-Ullrich and M. Poczatek, *Cytokine Growth Factor Rev* **2000**, *11*, 59-69.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]